

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 23 日 (23.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/056787 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 9/24, 15/09, 1/21, C12P 21/02, C07K 1/02 (74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中央ビル 5 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018184 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 7 日 (07.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-409692 2003 年 12 月 8 日 (08.12.2003) JP (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1048002 東京都中央区京橋二丁目 4 番 1 6 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺 学 (WATANABE, Manabu) [JP/JP]; 〒2500852 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内 Kanagawa (JP). 矢内 耕二 (YANAI, Koji) [JP/JP]; 〒2500852 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内 Kanagawa (JP). 露木 由美子 (TSUYUKI, Yumiko) [JP/JP]; 〒2500852 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内 Kanagawa (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SURFACTANT-TOLERANT CELLULASE AND METHOD OF CONVERTING THE SAME

(54) 発明の名称: 界面活性剤に耐性なセルラーゼ及びその変換方法

(57) Abstract: A method of inhibiting a lowering in endoglucanase activity in the presence of a surfactant characterized by comprising modifying a protein having the endoglucanase activity and carrying no pyroglutamic acid at the N-end into another protein carrying pyroglutamic acid at the N-end. A protein having endoglucanase activity and having been modified into pyroglutamic acid at the N-end by amino acid modification; a polynucleotide encoding the above protein; an expression vector containing the above polynucleotide; a host cell transformed by the above expression vector; and a process for producing the above protein by culturing the above host cell.

(57) 要約: エンドグルカナーゼ活性を有し、且つ N 末端がピログルタミン酸でないタンパク質を、N 末端がピログルタミン酸であるタンパク質に改変することを特徴とする、界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下を抑制する方法を開示する。また、エンドグルカナーゼ活性を有し、且つアミノ酸改変により N 末端がピログルタミン酸に改変されたタンパク質、前記タンパク質をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、前記発現ベクターにより形質転換された宿主細胞、前記宿主細胞を培養する前記タンパク質の製造方法を開示する。

WO 2005/056787 A1

## 明 細 書

### 界面活性剤に耐性なセルラーゼ及びその変換方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質(特には、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するセルラーゼ)のN末端をピログルタミン酸に改変し、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないセルラーゼに変換する方法及びそのセルラーゼに関する。

#### 背景技術

- [0002] セルロース系バイオマスは天然に最も多く存在する資源であるといわれている。よってこれを分解するセルラーゼ系を効率良く利用することは様々な分野で嘱望されている。この過程で、様々なセルラーゼが精製され、その特性が解明されてきた。更に、様々なセルラーゼがクローニングされ、その配列の相同性を解析し、ファミリー分類がなされるまでに到っている(非特許文献1参照)。

一方、セルラーゼはその特性を活かしてさまざまな産業分野で利用されているが、繊維加工分野での利用は重要である。例えば、セルロース含有繊維の肌ざわり及び／又は外観を改善するため、又は着色されたセルロース含有繊維に色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」様外観を与える「バイオウオッシュ」のためにセルラーゼが使用されている。また、近年その強度や吸水性などの性質、更には環境汚染を起こしにくい製造法から注目を集めている木材パルプ由来の再生セルロース系繊維であるリヨセルを、製造工程で発生する織物表面の毛羽を除く加工にセルラーゼが用いられている。

- [0003] これまで、セルラーゼは複数の酵素の共同作用、即ちシナジー効果によりセルロースを分解するとされてきた。この複合酵素系のセルラーゼ群には、繊維強度を低下させるなど繊維加工分野では好ましくない性質を有する酵素系も含まれる。そこで、タンパク質分離技術や遺伝子工学的手法を用いて、これらセルラーゼ群から、繊維加工に適した酵素成分を分離し製造する試みがなされている。とりわけ、糸状菌のトリコデルマ(Trichoderma)属、フミコーラ(Humicola)属由来のセルラーゼについては

研究が進み、フミコーラ属では、CBH I、EG V(特許文献1参照)、NCE2、NCE4、NCE5などが、トリコデルマ属では、CBH I、CBH II、EG II、EG IIIなどの成分が単離され、遺伝子操作によって過剰発現酵素やモノコンポーネント酵素などを調製することにより、各用途に適した特定セルラーゼ成分を多量に含むセルラーゼ調製物が製造されるようになってきた。更に、NCE4(特許文献2参照)、NCE5(特許文献3参照)、RCE1(特許文献4参照)、STCE1(国際出願第PCT/JP2004/15733号明細書参照)などファミリー45に属するセルラーゼが上述した分野において非常に有用であることも明らかとなっている。

[0004] 一方、セルラーゼを衣料用洗剤用途に用いる場合には、必要なセルラーゼ成分を量的に改善するだけでなく質的に改善することが望まれている。即ち、衣料用洗剤には各種界面活性剤が配合されているとともに、これを水に溶解した場合アルカリ性(pH10～11)を示すことから、衣料用洗剤に配合されるセルラーゼの性質としてアルカリ条件下で各種界面活性剤に対して耐性を示すことが求められている。これまで、界面活性剤存在下での活性低下を抑制する例としては、Otzen, D. E. らは、フミコーラ・インソレンス(*Humicola insolens*)由来Cel45の内部アミノ酸配列に変異を導入し、pH7の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)存在下での活性が約3.3倍に向上していると報告している(非特許文献2参照)。しかしながら、本変異により付与される界面活性剤存在下での活性低下の抑制は、Cel45又はその相同体に限定され、Cel45と相同性の低いファミリー45に属するエンドグルカナーゼには適用できないことが明らかとなっている。

[0005] 特許文献1:国際公開第91/17243号パンフレット

特許文献2:国際公開第98/03667号パンフレット

特許文献3:国際公開第01/90375号パンフレット

特許文献4:国際公開第00/24879号パンフレット

非特許文献1:Henrissat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316:695-696(1996)

非特許文献2:Daniel E. Otzen, Lars Christiansen, Martin Schulein.

A comparative study of the unfolding of the endoglucanase Cel45 from *Humicola insolens* in denaturant and surfactant. *Protein Sci.* 8:1878–1887(1999)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質、特に、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質を界面活性剤存在下で活性低下の少ないタンパク質に変換する方法、その方法に使用するベクター、界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質、それをコードするポリヌクレオチドなどの提供を目的としている。更に、それらを用いることにより、衣料用洗浄用酵素として利用することのできるタンパク質を効率よく生産する微生物の提供を目的としている。

### 課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った。その結果、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質のN末端側にピログルタミン酸(以下、pQの略称を用いることがある)又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加したタンパク質、すなわちN末端付加型セルラーゼが、その天然型セルラーゼと比較し、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性が明らかに低下しないことを見出した。
- [0008] アニオン系界面活性剤存在下で高いエンドグルカナーゼ活性が保持されるという性質は、衣料用洗浄用酵素として特に有用であり、このようなセルラーゼに関する知見は今までに全くなかった。また、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加することによって、界面活性剤存在下で、酵素に本来備わる機能の低下を防ぐことが可能であるとの知見もこれまでに報告されていなかった。
- [0009] 本発明の別の態様としては、界面活性剤存在下で活性を低下させたくない全てのN末端アミノ基が保護されていないセルラーゼに、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加することにより、界面活性剤存在下での活性の低下を抑制することが可能となる。ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付

加できるセルラーゼは特に限定されることはなく、例えば、ファミリー45に属するセルラーゼが好ましい。

[0010] 従って、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質を、N末端がピログルタミン酸であるタンパク質に改変することを特徴とする、界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下を抑制する方法。

(2) エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質のN末端に、ピログルタミン酸、若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸、又はピログルタミン酸若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端に含むペプチドを付加することにより、タンパク質の改変を実施する、前記(1)に記載の方法。

(3) エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質のN末端アミノ酸、又はそれを含む領域を、ピログルタミン酸、若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸、又はピログルタミン酸若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端に含むペプチドで置換することにより、タンパク質の改変を実施する、前記(1)に記載の方法。

(4) エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質が、ファミリー45に属するセルラーゼである、前記(1)～(3)のいずれか一つに記載の方法。

(5) エンドグルカナーゼ活性を有し、且つアミノ酸改変によりN末端がピログルタミン酸に改変された、改変タンパク質。

(6) 前記(1)～(4)のいずれか一つに記載の方法により得ることのできる、前記(5)に記載のタンパク質。

(7) 下記からなる群より選択される、タンパク質：

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性

を有する改変タンパク質、及び

(c) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する相同タンパク質。

(8) 前記(5)〜(7)のいずれか一つに記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(9) 下記からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(a) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(10) 前記(8)又は(9)に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

(11) 前記(10)に記載の発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

(12) 宿主が、酵母又は糸状菌である、前記(11)に記載の宿主細胞。

(13) 糸状菌が、フミコーラ属又はトリコデルマ属に属する微生物である、前記(12)に記載の宿主細胞。

(14) 糸状菌が、フミコーラ・インソレンス又はトリコデルマ・ビリデである、前記(13)に記載の宿主細胞。

(15) 前記(11)〜(14)のいずれか一つに記載の宿主細胞を培養する工程、及び前記培養によって得られる宿主細胞又はその培養物から前記(5)〜(7)のいずれか一つに記載のタンパク質を採取する工程を含む、前記タンパク質の製造方法。

(16)前記(15)に記載の製造方法で生産されたタンパク質。

## 発明の効果

- [0011] 本発明によれば、衣料用洗浄用酵素として利用することのできる従来にない界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないセルラーゼを効率よく生産することが可能になる。

## 発明を実施するための最良の形態

- [0012] ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質(以下、単に「ファミリー45に属するセルラーゼ」と略記することもある)

### ファミリー45

本明細書における「ファミリー45」とは、Henrissat B. らによる糖質活性化酵素(Carbohydrate activating enzyme)の疎水性クラスター解析(Hydrophobic cluster analysis)によりファミリー45に分類されたものをいう[Henrissat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316:695-696(1996). ]。

- [0013] エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質

本明細書における「エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質」とは、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素、すなわちエンド-1, 4- $\beta$ -グルカナーゼ(EC3. 2. 1. 4)を意味し、前記酵素は、 $\beta$ -1, 4-グルカンの $\beta$ -1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解する。

- [0014] 界面活性剤

本明細書における「界面活性剤」とは、衣料用洗浄剤に配合される洗浄成分であり、アニオン系、カチオン系及びノニオン系界面活性剤に大別されるが、アニオン系界面活性剤が主に用いられている。本発明の好適な例としては、アニオン系界面活性剤として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(以下、単に「LAS」と略記することもある)を挙げることができる。

- [0015] エンドグルカナーゼ(EGU)活性

本明細書における「エンドグルカナーゼ(以下、単に「EGU」と略記することもある)活性」とは、カルボキシメチルセルロース溶液の粘度低下を測定し、これを酵素活性

として定量したものであり、実験の詳細は以下の通りである。

基質溶液として、カルボキシメチルセルロース(Hercules社製)を終濃度3.5%となるように、0.1mol/Lトリス塩酸緩衝液(pH10.0)に溶解した。この基質溶液5mLを40℃で10分間予め加温し、これに酵素溶液0.15mLを加え、良く攪拌し、40℃で30分間反応させた。この反応液を、40℃に設定しておいたR型粘度計(東機産業RE100)で粘度を測定した。酵素活性は、各反応条件下において、初期粘度を1/2に低下させる酵素量を1単位とした。アニオン系界面活性剤は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(和光純薬製)を用い、終濃度800ppmとなるようカルボキシメチルセルロース溶液に添加した。

[0016] 界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下の抑制

本明細書における「界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下が少ない」とは、N末端が改変された本発明のタンパク質(N末端改変型タンパク質)と、その改変前のタンパク質(以下、改変前タンパク質と称する)とを、界面活性剤存在下におけるエンドグルカナーゼ活性を指標に比較した結果、エンドグルカナーゼ活性が改変前タンパク質に比べN末端改変型タンパク質の方が高いことを意味する。

[0017] 改変前タンパク質

本発明方法を適用することのできる改変前タンパク質は、エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質である限り、特に限定されるものではないが、例えば、セルラーゼ(例えば、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドラーゼ、又は $\beta$ -グルコシダーゼ)を挙げることができ、ファミリー45に属するセルラーゼが好ましい。なお、前記改変前タンパク質は、少なくともエンドグルカナーゼ活性を有する限り、エンドグルカナーゼ活性のみを有するタンパク質であることもできるし、エンドグルカナーゼ活性に加え、別の酵素活性を有するタンパク質であることもできる。また、天然型タンパク質であることも、遺伝子工学的に改変したタンパク質であることもできる。

[0018] ファミリー45に属するセルラーゼの由来

このファミリー45に属するセルラーゼは、慣用とされる遺伝子工学的手法、例えば、組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができるほか、天



然から分離された菌株から取得することもできる。更に、天然から得られるファミリー45に属するセルラーゼの変異体も含めることができる。

ファミリー45に属するセルラーゼは、例えば、糸状菌類又は接合菌類などの微生物から得ることができる。糸状菌類としては、例えば、フミコーラ属(例えば、フミコーラ・インソレンス)、トリコデルマ属(例えば、*Trichoderma viride*)、スタフィロトリクム属(*Staphylotrichum*) [例えば、スタフィロトリクム・ココスポラム(*Staphylotrichum coccosporum*)]、ミリオコッカム属[例えば、ミリオコッカム・サーモフィラム(*Myriococcum thermophilum*)]に属する微生物から得ることができる。具体的には、フミコーラ属由来のセルラーゼとしては、例えば、CBH I、EG V、NCE2、NCE4、NCE5などが、トリコデルマ属由来のセルラーゼとしては、例えば、CBH I、CBH II、EG II、EG IIIなどが、スタフィロトリクム属由来のセルラーゼとしては、例えば、STCE1、STCE3などが、ミリオコッカム属由来のセルラーゼとしては、例えば、MTE1などが挙げられる。接合菌類としては、例えば、リゾプス属(*Rhizopus*) [例えば、リゾプス・オリゼー(*Rhizopus oryzae*)]、ムコール属(*Mucor*) [例えば、ムコール・サーシネロイデス(*Mucor circinelloides*)]、ファイコマイセス属(*Phycomyces*) [例えば、ファイコマイセス・ニテンス(*Phycomyces nitens*)]に属する微生物から得ることができる。具体的には、例えば、リゾプス・オリゼー由来のRCE I、RCE II、RCE I II、ムコール・サーシネロイデス由来のMCE I、MCE IIとファイコマイセス・ニテンス由来のPCE Iがある(国際公開第00/24879号パンフレット)。

[0019] ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチド

本明細書において「ピログルタミン酸」とは、成熟タンパク質のN末端グルタミン又はグルタミン酸が環化され、ピログルタミン酸となったものを意味する。このピログルタミン酸は、N末端側アミノ基を提示しないことが特徴であり、インビボ(in vivo)又はインビトロ(in vitro)のどちらでもピログルタミン酸化が可能である。インビボにおいては、成熟N末端がグルタミン又はグルタミン酸になるように、成熟タンパク質を遺伝子工学的的手法によりデザインした改変タンパク質をコードしたポリヌクレオチドを宿主内で発現させることにより、ピログルタミン酸化タンパク質が取得される。インビトロにおいては、蟻酸などの酸性溶液を用いて、N末端にグルタミン又はグルタミン酸を有す

るタンパク質を処理することによって、ピログルタミン酸化タンパク質を取得することができる。

[0020] 本明細書において「ペプチド」とは、1ないしは複数個のアミノ酸からなる、ペプチド結合により重合したアミノ酸群を意味する。従って、本明細書において「ピログルタミン酸を含むペプチド」とは、ピログルタミン酸をN末端アミノ酸とするペプチドを意味する。ピログルタミン酸を含むペプチドは、2〜複数個のアミノ酸からなり、例えば、2〜40個、好ましくは2〜30個、より好ましくは2〜20個、更に好ましくは2〜10個、特に好ましくは2〜5個、更に特に好ましくは2〜4個のアミノ酸配列が架橋されているものである。ここでいうアミノ酸は当業者が使用できるものであれば、特に限定されるものではない。

[0021] 本発明方法において、改変前タンパク質を、N末端がピログルタミン酸であるタンパク質に改変する手段としては、前記タンパク質改変が可能である限り、特に限定されるものではないが、例えば、遺伝子工学的手法又は化学的手法を挙げることができる。

[0022] 遺伝子工学的手法によれば、例えば、適当なアミノ酸又はアミノ酸配列の遺伝子工学的な付加及び／又は置換により、改変前タンパク質の改変を行うことができる。

遺伝子工学的な付加を利用する態様では、改変前タンパク質（エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質）のN末端に、ピログルタミン酸を遺伝子工学的に付加するか、あるいは、ピログルタミン酸をN末端を含むペプチドを遺伝子工学的に付加することにより、タンパク質の改変を実施することができる。

より具体的には、前記態様は、例えば、

(1) 改変前タンパク質をコードするポリヌクレオチドの5'末端に、ピログルタミン酸化可能なアミノ酸（例えば、グルタミン酸又はグルタミン）をコードするポリヌクレオチド、あるいは、ピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端を含むペプチドをコードするポリヌクレオチドを付加する工程；

(2) 前記工程(1)で得られたポリヌクレオチドを、N末端アミノ酸のピログルタミン酸化が可能な宿主で発現させる工程

を含むことができる。

[0023] 遺伝子工学的な置換を利用する態様では、改変前タンパク質のN末端アミノ酸、又はそれを含む領域を、ピログルタミン酸で遺伝子工学的に置換するか、あるいは、ピログルタミン酸をN末端に含むペプチドで遺伝子工学的に置換することにより、タンパク質の改変を実施することができる。

より具体的には、前記態様は、例えば、

(1) 改変前タンパク質をコードするポリヌクレオチドの5'末端、又はそれを含む領域を、ピログルタミン酸化可能なアミノ酸(例えば、グルタミン酸又はグルタミン)をコードするポリヌクレオチド、あるいは、ピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端に含むペプチドをコードするポリヌクレオチドで置換する工程；

(2) 前記工程(1)で得られたポリヌクレオチドを、N末端アミノ酸のピログルタミン酸化が可能な宿主で発現させる工程

を含むことができる。

[0024] 一方、化学的手法によるタンパク質改変としては、例えば、

(a) 改変前タンパク質のN末端に、化学的にピログルタミン酸(又はピログルタミン酸をN末端に含むペプチド)を直接付加する態様；

(b) 改変前タンパク質のN末端に、ピログルタミン酸化可能なアミノ酸(又はピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端に含むペプチド)を化学的に付加した後、そのN末端アミノ酸を化学的にピログルタミン酸化する態様；あるいは、

(c) 改変前タンパク質(但し、N末端がピログルタミン酸化可能なアミノ酸である場合)のN末端を化学的にピログルタミン酸化する態様

を挙げることができる。

[0025] ファミリー45に属するセルラーゼのN末端側に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加する方法

より具体的な改変方法について、ファミリー45に属するセルラーゼを例にとって説明する。ファミリー45に属するセルラーゼのN末端側に、ピログルタミン酸又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加する方法は、遺伝子工学的手法を用いることにより得ることができる。一般的なセルラーゼの生産法としては、例えば糸状菌を用いて、

目的とするセルラーゼをコードするポリヌクレオチドの翻訳領域を宿主で機能するプロモーター及びターミネーターの間に正しく連結し、この発現カセットを宿主に導入することによりなし得る。更に、宿主細胞で機能する分泌シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを付加し、宿主細胞に導入すると培地中に分泌されることから、目的とするセルラーゼを容易に回収することができる。このとき、分泌シグナル配列の直下に付加したいアミノ酸をコードするポリヌクレオチドを付加することによりセルラーゼのN末端側へ所望のアミノ酸を付加することができる。更に、N末端アミノ酸のアミノ基の修飾は、宿主の分泌シグナル配列を用いれば良く、例えばトリコデルマ・ビリデ由来のcbh1やcbh2、フミコーラ・インソレンス由来のNCE2やNCE5はN末端がピログルタミン酸化しているので、これらの分泌シグナル配列を用いて、それぞれトリコデルマ・ビリデやフミコーラ・インソレンスを用いて発現させることにより調製できる。本発明の好ましい態様によれば、以上のように調製されたファミリー45に属するセルラーゼは、界面活性剤存在下で活性の低下が少ないという有利な性質を有している。

[0026] また、別の態様によれば、当業者が実施可能な程度の範囲内で、全合成することによって得ることもできる。この場合、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。

[0027] 本発明のタンパク質

本発明のタンパク質とは、エンドグルカナーゼ活性を有する改変前タンパク質のN末端をピログルタミン酸に改変したもの[例えば、ファミリー45に属するセルラーゼを取得し、その成熟タンパク質のN末端アミノ酸側に、ピログルタミン酸(pQ)又はピログルタミン酸を含むペプチドを付加したもの]であって、界面活性剤存在下でエンドグルカナーゼ活性の低下が少ないものである。また、前述の方法によって得られ得る、界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有する、タンパク質である。

[0028] 例えば、下記からなる群より選択される、タンパク質が含まれる：

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含む、タンパク質、

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表されるアミノ酸配

列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質、

(c)配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する相同タンパク質。

[0029] 配列番号2で表されるアミノ酸配列は、フミコーラ・インソレンスMN200-1株由来エンドグルカナーゼNCE4のN末端に、5アミノ酸からなるペプチド(N末端がピログルタミン酸)が付加されたN末端付加型NCE4(実施例A2参照)のアミノ酸配列である。

配列番号4で表されるアミノ酸配列は、スタフィロトリクム・ココスポラムIFO 31817株由来エンドグルカナーゼSTCE1のN末端アミノ酸(Ala)を、4アミノ酸からなるペプチド(N末端がピログルタミン酸)で置換されたN末端置換型STCE1(実施例B2参照)のアミノ酸配列である。

配列番号38で表されるアミノ酸配列は、スタフィロトリクム・ココスポラムIFO 31817株由来エンドグルカナーゼSTCE1のN末端に、ピログルタミン酸が付加されたピログルタミン酸付加型STCE1(実施例B3参照)のアミノ酸配列である。

配列番号40で表されるアミノ酸配列は、スタフィロトリクム・ココスポラムIFO 31817株由来エンドグルカナーゼSTCE1のN末端に、4アミノ酸からなるペプチド(N末端がピログルタミン酸)が付加されたN末端付加型STCE1(実施例B4参照)のアミノ酸配列である。

[0030] 本発明における「改変タンパク質」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40のアミノ酸配列において、1個又は複数個(例えば、1又は数個)のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質である。ここで、「欠失、置換、挿入、又は付加」などの改変に係るアミノ酸の数は、好ましくは1-30個、より好ましくは1-10個、更に好ましくは1-6個である。

[0031] 更に、改変タンパク質には、配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸残基が、保存的置換されたアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性の低下が少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質を包含する。ここで、「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に改変しないように1個又は複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸で置き換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような保存的置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。具体的には、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性(中性)アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

[0032] 本発明における「相同タンパク質」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と少なくとも85%、好ましくは90%、最も好ましくは95%以上の相同性(配列同一性)を有するアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質である。ここで示した相同性の数値は、当業者に公知の相同性検索プログラムであるFASTA3[Science, 227, 1435-1441(1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448(1988); <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]においてデフォルト(初期設定)のパラメータを用いて算出される数値(同一性; identity)を示す。

[0033] 先述したとおり、本発明のタンパク質の1つである「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質」において、N末端に付加された5アミノ酸からなるペプチドを除いた部分は、エンドグルカナーゼNCE4に由来する。また、本発明のタンパク質である「配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表されるアミノ酸配列からなるタン

パク質」において、N末端のアミノ酸又はペプチドを除いた部分は、エンドグルカナーゼSTCE1に由来する。

エンドグルカナーゼNCE4及びSTCE1は、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼであり、ファミリー45に属する公知のエンドグルカナーゼとしては、例えば、フミコーラ属由来のNCE5(国際公開第01/90375号パンフレット)を挙げることができる。

[0034] 図1及び図2に、エンドグルカナーゼSTCE1のアミノ酸配列[シグナルペプチド(配列番号43)及び成熟タンパク質(配列番号44)]、エンドグルカナーゼNCE4[シグナルペプチド(配列番号45)及び成熟タンパク質(配列番号46)]、及びNCE5[シグナルペプチド(配列番号47)及び成熟タンパク質(配列番号48)]の各アミノ酸配列を比較した結果を示す。

図1は前半部(N末端側)の結果を示し、図2は後半部(C末端側)の結果を示す。図1及び図2において、記号「\*」は、STCE1と共通するアミノ酸であることを示す。

[0035] 図1及び図2に示すとおり、ファミリー45に属するエンドグルカナーゼは、共通するドメインとして触媒領域(catalytic domain)(1番〜207番)を有し、場合により、更に、リンカー領域(Linker)(208番〜258番)及び／又はセルロース結合領域(cellulose-binding domain; CBD)(259番〜295番)を有することがある。なお、各ドメインの後の括弧内に示す番号は、エンドグルカナーゼSTCE1のアミノ酸配列(配列番号44)におけるアミノ酸番号である。

[0036] 前記各領域の内、触媒領域及びセルロース結合領域では、各エンドグルカナーゼ間で多くの保存アミノ酸が認められるのに対して、リンカー領域では顕著な保存領域は認められない。保存アミノ酸を多く含む領域(例えば、触媒領域又はセルロース結合領域、特には触媒領域)、あるいは、その領域に含まれる共通アミノ酸は、エンドグルカナーゼ(例えば、STCE1又はNCE4)の酵素活性に重要な領域又はアミノ酸と考えられるため、それ以外の領域又はアミノ酸においてアミノ酸改変(例えば、欠失、置換、挿入、及び／又は付加、特には保存的置換)を行うことにより、その酵素活性を維持した改変タンパク質又は相同タンパク質を、過度の実験を必要とすることなく、高い確率で取得することができる。

[0037] また、保存アミノ酸を多く含む領域であっても、各エンドグルカナーゼ間で非共通の

アミノ酸は、別のアミノ酸(好ましくは、保存的置換可能な類似アミノ酸)に改変してもその酵素活性を維持する可能性が高く、このようなアミノ酸改変を行うことによって、その酵素活性を維持した改変タンパク質又は相同タンパク質を、過度の実験を必要とすることなく、高い確率で取得することができる。

なお、保存アミノ酸を多く含む領域における共通アミノ酸であっても、別のアミノ酸に改変してもその酵素活性が維持されることがあり、特に保存的置換可能な類似アミノ酸に改変した場合、その可能性は高くなる。本発明の改変タンパク質又は相同タンパク質には、エンドグルカナーゼ活性を有する限り、任意の領域、例えば、触媒領域、リンカー領域、又はセルロース結合領域に含まれるアミノ酸を改変したタンパク質が含まれる。

[0038] 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド

本発明によれば、配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、その改変タンパク質、及び相同タンパク質(以下、単に「本発明のタンパク質」という)をコードするポリヌクレオチドが提供される。タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は容易に定まり、よって、本発明のタンパク質をコードする種々の塩基配列を選択することができる。なお、本明細書において、用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれ、DNAが好ましい。

[0039] 例えば、下記からなる群より選択される、ポリヌクレオチドが含まれる:

(a) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコー



ドするポリヌクレオチド。

[0040] 前記(b)の塩基配列において、欠失、置換、挿入、又は付加されてもよい塩基の数は、具体的には1〜90個、好ましくは1〜30個、より好ましくは1〜18個、更に好ましくは1〜9個である。

[0041] ここで、前記(c)における「ストリンジェントな条件下」とは、配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドを用い、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング検出システム(アマシャム社製)の添付の操作方法に従って、42℃で1時間のプレハイブリダイゼーションの後、前記ポリヌクレオチドを添加し、42℃で14〜16時間のハイブリダイゼーションを行った後、0.4% SDS及び6mol/L尿素添加0.5倍濃度のSSC(1倍濃度のSSC;15mmol/Lクエン酸三ナトリウム、150mmol/L塩化ナトリウム)で42℃にて20分間の洗浄を2回繰り返し、次に5倍濃度のSSCで室温にて5分間の洗浄を2回行う条件である。

[0042] 本発明によるポリヌクレオチドは、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよく、また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。本発明によるポリヌクレオチドの典型的な取得方法としては、微生物のゲノミクライブラリーから、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば、部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当なDNAプローブを用いて、スクリーニングを行う方法などが挙げられる。

[0043] 本発明のタンパク質の生産

本発明のタンパク質は、それをコードするポリヌクレオチド断片を、宿主細胞内で複製可能且つ同遺伝子が発現可能な状態で含むポリヌクレオチド分子、特に発現ベクターの形態として宿主細胞の形質転換を行い、その宿主細胞において産生させることができる。

[0044] よって、本発明においては、前記の本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド断片を、宿主微生物内で複製可能で、且つ、そのポリヌクレオチド断片がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。

[0045] 本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築すること

ができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

[0046] 本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるポリヌクレオチド断片の他に、その発現を制御するポリヌクレオチドや形質転換体を選択するための遺伝子マーカーなどを含んでいるのが望ましい。

[0047] 本発明に用いる発現を制御するポリヌクレオチドとしては、プロモーター、ターミネーター及び分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチドなどの転写調節信号、翻訳調節信号がこれに含まれる。これらの制御するポリヌクレオチドの連結及びベクターへの挿入は、常法により行なうことができる。

[0048] 本発明に用いるプロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するポリヌクレオチドとして得ることができる。プロモーターとしては、大腸菌においては、例えば、ラクトースオペロン、トリプトファンオペロンなどのプロモーター、酵母では、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、酸性フォスファターゼ遺伝子、ガラクトース資化性遺伝子、グリセロールアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子などのプロモーター、カビとして、例えば、糸状菌では $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、グルコアミラーゼ遺伝子、セロビオハイドロラーゼ遺伝子、グリセロールアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子などのプロモーターを選択することができる。

[0049] また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導されるポリヌクレオチドより得ることができる。

[0050] また、本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば、薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。使用する宿主が細菌の場合は、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などであり、使

用する宿主が酵母の場合は、例えば、トリプトファン生合成遺伝子(*trpI*, *trpC*)、ウラシル生合成遺伝子(*ura3*)、ロイシン生合成遺伝子(*leu2*)、ヒスチジン生合成遺伝子(*his3*)、使用する宿主がカビ、例えば、糸状菌の場合は、例えば、デストマイシン耐性遺伝子、硝酸資化遺伝子(*niaD*)、アルギニン生合成遺伝子(*argB*)、ウラシル生合成遺伝子(*pyr4*)、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ビアラホス耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子、オーレオバシジン耐性遺伝子などが挙げられる。

[0051] 本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、及びそれらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。宿主として、酵母を用いる場合は、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、ピキア属(*Pichia*)に属する微生物などが、好ましくはサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)が挙げられる。糸状菌を用いる場合には、いかなる糸状菌を用いてもよいが、好ましくは、フミコーラ属、トリコデルマ属、アスペルギルス属、アクレモニウム属(*Acremonium*)、フザリウム属(*Fusarium*)に属する微生物であり、より好ましくは、フミコーラ属、又はトリコデルマ属が挙げられる。より具体的には、フミコーラ・インソレンス、フミコーラ・サーモイデア(*Humicola thermoidea*)、トリコデルマ・ベリデ、トリコデルマ・レーセイ(*Trichoderma reesei*)、トリコデルマ・ロンジブラシアトゥム(*Trichoderma longibrachiatum*)、スタフィロトリクム・ココスポラム、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、フザリウム・オキシスポーラム(*Fusarium oxysporum*)、又はアクレモニウム・セルロリティカス(*Acremonium cellulolyticus*)が挙げられるが、更により好ましくは、フミコーラ・インソレンス、又はトリコデルマ・ベリデが挙げられる。

[0052] また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。好ましい具体例としては、例えば、カルシウムイオン法、リチウムイオン法、エレクトロポレーション法、PEG法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法などのような常法を用いることができ、形質転換される宿主に応じて選択することができる。

[0053] 本発明においては、本発明の形質転換体を培養し、その培養物から所望とする本

発明のタンパク質を得ることができる。本発明による形質転換体の培養は、常法に従って、培地、培養条件などを適宜選択することにより行うことができる。

[0054] 培地としては、本発明の形質転換体が同化し得る炭素源、資化し得る窒素源、無機塩類、各種ビタミン、グルタミン酸又はアスパラギンなどの各種アミノ酸、ヌクレオチドなどの微量栄養素、抗生物質などの選抜薬剤を添加することもできる。また、本発明の形質転換体の発育を助け、本発明のタンパク質の生産を促進するような有機物及び／又は無機物を適当に添加することができる。更に、必要に応じてその他の栄養物をほどよく含有する合成培地又は天然培地を使用することができる。

[0055] 培地に使用される炭素源及び窒素源としては、本発明の形質転換体の利用可能なものであれば何れの種類でも良い。同化し得る炭素源としては、例えばショ糖、澱粉、グリセリン、グルコース、フラクトース、マルトース、ラクトース、セルロース、セロビオース、デキストリン、動物油、植物油、又はそれらの加水分解物などの種々の炭水化物が利用できる。その濃度は通常、培地に対して0.1%～5%であることが好ましい。資化し得る窒素源としては、例えば、ペプトン、肉エキス、コーン・ステープ・リカー、脱脂大豆粉などの動植物体成分、浸出エキス類、コハク酸アンモニウム塩類、酒石酸アンモニウムなどの有機酸アンモニウム類、尿素、又はその他各種無機酸若しくは有機酸などの含窒素化合物も使用可能である。また、無機塩類としては、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸又はその他のイオンを生成することのできる塩類が適宜使用できる。

[0056] その他の成分として、例えば、酵母などの微生物の菌体、浸出液及び浸出エキスなど、また植物体の細末を含む培地であっても本発明の形質転換体の生育及び本発明のタンパク質の生産蓄積を妨げない限り何れをも適宜使用し得る。また、栄養要求性を示す変異株を培養する場合には、その栄養要求性を満足させ得る物質を培地に加えるが、この種の栄養素は、天然物を含む培地を使用する場合は、特に添加を必要としない場合がある。

[0057] これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気量などの培養条件は、使用する形質転換体及び外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることはいうまでもない。液体培養において、発泡があるときは、

シリコン油、植物油、鉱物油、界面活性剤などの消泡剤を適宜使用することができる。

[0058] このようにして得られた培養物に蓄積される本発明のタンパク質は、本発明の形質転換体内及び培養濾液中に含有されるので、培養物を遠心分離して培養物と形質転換体とに分離し、各々から本発明のタンパク質を採取することが可能である。

[0059] 培養濾液から本発明のタンパク質を採取するには、常法に従い、培養物から本発明のタンパク質を採取するのに用いられる手段を、単独若しくは任意の順序に組合せ又は反復して用いられる。すなわち、例えば、抽出濾過、遠心分離、透析、濃縮、乾燥、凍結、吸着、脱着、各種溶液に対する溶解度の差を利用した方法(例えば、沈殿、塩析、結晶化、再結晶、転溶、クロマトグラフィーなど)などの手段が用いられる。

[0060] また、本発明の形質転換体内の培養物から、本発明のタンパク質を取得することができる。常法に従い、例えば、培養物から抽出(磨砕処理、加圧破碎など)、回収(濾過、遠心分離など)及び精製(塩析法、溶媒沈殿法など)などの手法が用いられる。

[0061] 得られた粗物質は、常法に従い、例えば、デキストラン、セルロース、アガロース、合成ポリマー、シリカゲルなどの担体を用いる各種カラムクロマトグラフィーにより精製することができる。上記に示した方法、又はこれらを適宜組み合わせることにより、本発明の形質転換体の培養物から所望とする純粋な本発明のタンパク質が得られる。

[0062] 従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

[0063] 寄託菌株

本発明による発現ベクターpEGD01で形質転換された大腸菌JM109株(FERM BP-5973)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)]に、平成8年(1996年)7月12日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)6月13日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-59

73[FERM P-15729]である。

[0064] 本発明による発現ベクターpMKD01で形質転換された大腸菌JM109株(FERM BP-5974)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)]に、平成8年(1996年)7月12日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)6月13日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-5974[FERM P-15730]である。

[0065] プラスミドpCB1-M2XRで形質転換された大腸菌JM109株(FERM BP-6045)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)]に、平成8年(1996年)9月9日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)8月11日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-6045[FERM P-15840]である。

ここで、本発明によるプラスミドpCB1-M2は、後述する実施例に記載の方法から取得する以外の態様として、例えば、プラスミドpCB1-M2XRを制限酵素XbaIで消化し、自己閉環することによっても得ることができる。

[0066] 本発明による発現ベクターの宿主となりうるフミコーラ・インソレンス MN200-1株(FERM BP-5977)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)]に、平成8年(1996年)7月15日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)6月13日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-5977[FERM P-15736]である。

[0067] 本発明による発現ベクターの宿主となりうるトリコデルマ・ビリデ MC300-1株(FERM BP-6047)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター[(旧)通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:〒305-8566 日

本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)]に、平成8年(1996年)9月9日より国内寄託されたものであり、平成9年(1997年)8月11日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-6047[FERM P-15842]である。

- [0068] プラスミドpUC118-STCEexで形質転換された大腸菌DH5 $\alpha$  (FERM BP-10127)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に、平成15年(2003年)12月1日に国内寄託されたものであり、平成16年(2004年)9月15日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-10127[FERM P-19602]である。なお、プラスミドpUC118-STCEexは、プラスミドpUC118のBamHI部位にSTCE遺伝子を挿入したものである。このBamHI断片に含まれるエンドグルカナーゼSTCE1遺伝子は、イントロンを含み、配列番号5に表される配列を有する。

### 実施例

- [0069] 以下に本発明の実施例を示すが、これは単なる一例であって本発明を限定するものではなく、ここに例示しなかった多くの変法あるいは修飾手段のすべてを包括するものである。
- [0070] 《実施例A1:フミコーラ・インソレンス用N末端付加型セルラーゼ発現ベクター及び天然型セルラーゼ発現ベクターの構築》
- (1) N末端付加型セルラーゼ発現ベクターpMKD01の構築
- プラスミドpUC118(タカラバイオ社製)をBamHIで消化し、得られる断片をDNAブランチングキット(タカラバイオ社製)を用いて末端を平滑化した。これをDNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて自己閉環させpUC118-BNを得た。このpUC118BNをSphIで消化し、末端平滑化、自己閉環させ、pUC118BSNを得た。次に、フミコーラ・インソレンス MN200-1株(FERM BP-5977)から、特開平8-126492号公報に記載の方法にしたがって、セルラーゼNCE2遺伝子の全長を含むPstI-XbaI断片3.4kbを得た。これを同様の制限酵素で消化しておいたpUC118BSNと連結し、pUC118BSN-PXを得た。このpUC118BSN-PXに部位指

定変異をスカルプターインビトロミュータジェネシスシステム(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて導入し、プラスミドpM21を構築した。変異導入用オリゴヌクレオチドMNC-02及びMNC-03を用いた。

[0071] MNC-02: 5'-GAGCGCCAGAACTGTGGATCCACTTGGTGAGCAATG-3' (配列番号6)

MNC-03: 5'-TCCGCCGTTCTGAGCGGATCCAGGCGTTTGGCGCG-3' (配列番号7)

[0072] このプラスミドpM21をBamHIで消化し、これにフミコーラ・インソレンス MN200-1株由来セロビオハイドロラーゼ遺伝子(NCE3)のPCR断片をBamHIで消化したものを連結し、プラスミドpKM04を得た。NCE3のPCR断片は、以下のプライマーMKA-05及びMKA-06を用い、フミコーラ・インソレンス MN200-1株(FERM BP-5977)由来ゲノムDNA(国際公開第98/03640号パンフレット)を鋳型に増幅した。

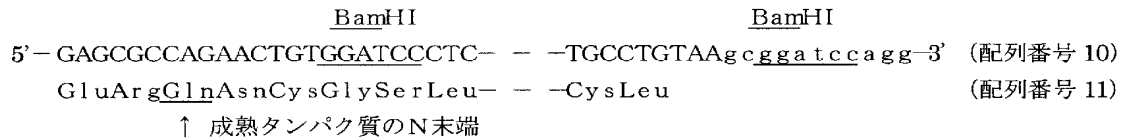
[0073] MKA-05: 5'-GCCGCCCAGCAGGCGGGATCCCTCACCACCGAGAGG-3' (配列番号8)

MKA-06: 5'-TGATCGTCGAGTCAGGGATCCAGAATTTACAGGCCA-3' (配列番号9)

[0074] 前記プラスミドpKM04に、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)由来trpC遺伝子のプロモーター及びターミネーター(Mullaney, E. J., et. al., Mol. Gen. Genet., 199, 37-45, 1985)を用いて特開昭59-175889号公報に記載されているデストマイシン耐性遺伝子をフミコーラ・インソレンスで発現可能にした遺伝子を作製した。これをXbaIで消化しておいたプラスミドpKM04と連結し、N末付加型セルラーゼ発現ベクターpMKD01(FERM BP-5974)を構築した。このpMKD01は、NCE2遺伝子の成熟タンパク質のN末端より下流10bp、終止コドンより下流3bpにBamHI認識配列を変異導入してあるので、所望のファミリー45に属するセルラーゼのN末端に更に5アミノ酸残基が付加するような構成となる。

[0075] [表1]





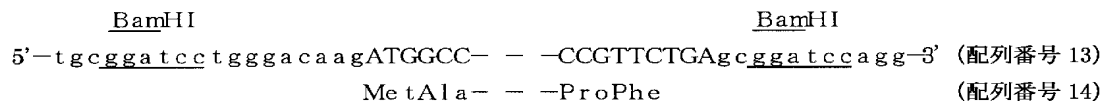
[0076] (2) 天然型セルラーゼ発現ベクターpJD01の構築

前記(1)で得られたプラスミドpM21にオリゴヌクレオチドpMN-Bamを用いて部位特異的変異を導入し、変異導入プラスミドpM21-m-A1を得た。

[0077] pMN-Bam: 5'-GGTCAAACAAGTCTGTGCGGATCCTGGGACAAGATGGCCAAGTTCTTCCTTAC-3' (配列番号12)

[0078] このpM21-m-A1を制限酵素HindIII及びBamHIで消化し、得られる約1kbの断片を回収した。次に、実施例A1(1)により得られたpMKD01をHindIII及びBamHIで消化し、約7kbの断片を回収した。これらの断片を連結し、プラスミドpJD01を得た。本ベクターは、NCE2遺伝子の翻訳開始点より上流15bp、終止コドンより下流3bpにBamHI認識配列を変異導入してあるので、転写開始点から所望のファミリー45に属するセルラーゼが発現するような構成となる。

[0079] [表2]



[0080] 《実施例A2: 天然型NCE4発現ベクター及びN末端付加型NCE4発現ベクターの構築、並びにフミコーラ・インソレンスへの形質転換及び活性評価》

(1) 発現ベクターの構築

天然型NCE4発現ベクターとして、実施例A1(2)により得られたpJD01に、NCE4遺伝子の翻訳領域全長を連結し、pN2EX-N4を構築した。

まず、NCE4遺伝子の翻訳領域全長を、プライマーNCE4-Ne及びNCE4-Ceの組み合わせで前記フミコーラ・インソレンス MN200-1株由来ゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、得られる約0.9kbpのPCR産物をBamHIで消化したものを調製した。これを同様の制限酵素で消化しておいたpJD01と連結し、pN2EX-N4を構築した。

[0081] NCE4-Ne: 5'-GGGGGGATCCTGGGACAAGATGCGTTCCTCCCCTC

TC-3' (配列番号15)

NCE4-Ce: 5'-GGGGGGATCCCTGCGTTTACAGGCACTGATGG-3' (配列番号16)

[0082] N末端付加型NCE4発現ベクターとして、実施例A1(1)により得られたpMKD01 (FERM BP-5974)に、NCE4遺伝子の分泌シグナル配列を除いた成熟タンパク質翻訳領域を連結し、pEGD01 (FERM BP-5973)を構築した。まず、NCE4遺伝子の成熟タンパク質翻訳領域をプライマーNCE4-Ns及びNCE4-Csの組み合わせで前記フミコーラ・インソレンス MN200-1株由来ゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、得られる約0.8kbpのPCR産物をBamHIで消化したものを調製した。これを同様の制限酵素で消化しておいたpMKD01と連結し、pEGD01を構築した。

[0083] NCE4-Ns: 5'-CCGGTGTTGGCCGGATCCGCTGATGGCAAG-3' (配列番号17)

NCE4-Cs: 5'-TAAGGCCCTCAAGGATCCCTGCGTCTACAG-3' (配列番号18)

[0084] (2)天然型NCE4及びN末端付加型NCE4を有する形質転換体

フミコーラ・インソレンス MN200-1株をS培地(3.0%グルコース、2.0%酵母エキス、0.1%ポリペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%硫酸マグネシウム、pH 6.8)、37℃で24時間培養し、遠心分離により菌糸体を回収し、0.5mol/Lシュークロースで洗浄した。これを3mg/mL  $\beta$ -グルクロニダーゼ(シグマ社製)、1mg/mL キチナーゼ及び1mg/mL ザイモリアーゼ20T(生化学工業社製)を含む0.5mol/Lシュークロース溶液に懸濁し、30℃で60-90分間緩やかに振とうし、プロトプラスト化した。得られたプロトプラストをろ過後、遠心分離により回収し、SUTC緩衝液(0.5mol/Lシュークロース、10mmol/L塩化カルシウム、10mmol/Lトリス塩酸、pH7.5)で洗浄し、再度SUTCに懸濁したもののプロトプラスト懸濁液とした。

100  $\mu$ Lのプロトプラスト懸濁液に対し、10  $\mu$ LのDNA(pEGD01又はpN2EX-N4)溶液を加え、氷冷下で5分間静置し、400  $\mu$ LのPEG溶液(60%ポリエチレングリコール4000、10mmol/L塩化カルシウム、10mmol/Lトリス塩酸、pH7.5)を加え、更に20分間氷冷下で静置した。以上の処理をしたプロトプラスト懸濁液は、SUT

C緩衝液で洗浄し、200  $\mu$ g/mLのハイグロマイシンBを含むYMG培地(1%グルコース、0.4%酵母エキス、0.2%麦芽エキス、1%寒天、pH6.8)にYMG軟寒天とともに重層し、37°Cで5日間培養し、生育したコロニーを形質転換体とした。

[0085] (3) 培養上澄中の天然型NCE4及びN末端付加型NCE4のEGU活性の比較

得られた形質転換体を国際公開第98/03667号パンフレットに準じて培養し、その培養上澄を得た。この培養上澄をSDS-PAGEに供し、約43kDaのNCE4のバンドが良好に検出される培養上澄を選抜した。この培養上澄のpH10及びpH10におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を比較した結果を表3に示す。表3はpH10のEGU活性を100とし、その百分率で示した。

[0086] [表3]

	発現ベクター	EGU (%)	
		LAS非添加	LAS添加
天然型NCE4	pN2EX-N4	100	27.1
N末端付加型NCE4	pEGD01	100	55.6

[0087] その結果、N末端付加型NCE4形質転換体から得られた培養上澄はLAS添加区での活性の減少が少なかった。LAS添加区のEGU活性を比較すると、N末端付加型NCE4は天然型NCE4の2.1倍の活性を有することが判明した。このときフミコーラ・インソレンス MN200-1株のEGU活性は形質転換体の約4%であることから、これらのEGU活性はそのほとんどが導入された発現ベクターによって発現された組換え酵素に由来することが判明した。

[0088] (4) 天然型NCE4及びN末端付加型NCE4のN末端アミノ酸配列の解析

前記形質転換体の培養上澄をSDS-PAGEに供し、電気泳動されたタンパク質をPVDF膜(ミリポア社製Immobilon-PSQ)に電氣的に転写した。このブロットから約43kDaのNCE4のバンドを切り出した。これをプロテインシークエンサーModel 492(アプライドバイオシステムズ社製)に供し、アミノ酸配列を解読した。

[0089] その結果、pN2EX-N4形質転換体から得られた天然型NCE4は、国際公開第98/03667号パンフレットに記載されたフミコーラ・インソレンス MN200-1株由来のNCE4のDNA配列と一致することを確認した。

一方、同様の手法によりpEGD01形質転換体から得られたN末端付加型NCE4はアミノ酸配列が解読できなかった。そこで、Pfuピログルタミン酸アミノペプチダーゼ(Pfu pyroglutamate aminopeptidase; タカラバイオ社製)を用いて修飾N末端を除去し、再度アミノ酸配列を解読した(配列番号2)。

これらの結果を基に、天然型NCE4及びN末端付加型NCE4のN末端アミノ酸及びその配列を比較するため、表4にまとめた。このことから構築した発現ベクターどおりのN末端アミノ酸配列を有するNCE4であることが明らかとなった。

[0090] [表4]

	N末端アミノ酸	N末端アミノ酸配列
天然型NCE4	アラニン (未修飾)	ADGKSTR (配列番号19)
N末端付加型NCE4	ピログルタミン酸 (修飾)	pQNCGSADGKSTR (配列番号20)

[0091] 《実施例B1:トリコデルマ・ビリデ用N末端置換型セルラーゼ発現ベクター及び天然型セルラーゼ発現ベクターの構築》

(1) 発現ベクターの構築

国際公開第98/11239号パンフレットに準じて得られるトリコデルマ・ビリデ MC300-1株由来cbh1遺伝子の全長を含む7kbのPstI断片からcbh1プロモーター領域を含む約3.1kbのHindIII断片及びターミネーター領域を含む2.7kbのSalI断片をプラスミドpUC119にクローン化したもの(それぞれプラスミドpCB1-H4及びプラスミドpCB1-S1)を構築した。このプラスミドを保持する大腸菌JM109株にヘルパーファージM13KO7を感染させることにより一本鎖DNAを得た。これらを鋳型に、リン酸化したオリゴヌクレオチドCBn-Stu及びCBc-XhoをそれぞれプラスミドpCB1-H4及びプラスミドpCB1-S1にアニールさせ、スカルプターインビトロミュータジェネシスシステム(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて変異を導入し、それぞれからプラスミドpCB1H4-19及びpCB1S1-17を構築した。次に、プラスミドpCB1H4-19をXbaI及びXhoIで消化し、得られる約6kbの断片と、プラスミドpCB1S1-17をXbaIで消化後、XhoIで部分的に消化し、得られる約1.2kbの断片を連結し、pCB1-Mを構築した。

[0092] CBn-Stu: 5'-GATACATGATGCGCAGGCCTTAGTTCGACTAGAATG

C-3' (配列番号21)

CBc-Xho: 5'-GATCCTCAAGCTTTTGCTCGAGTACCTTACAAGCA

C-3' (配列番号22)

[0093] 次に、pCB1-MをSalIで消化し、約2.7kbの断片をプラスミドpUC119にクローン化し、プラスミドpCB1-SalMを構築した。これを更に一本鎖DNAとし、リン酸化したオリゴヌクレオチドCB1-SmSph、CB1-Bam及びCB1-Pstをアニールさせ、スカルプターインビトロミュータジェネシスシステムを用いて変異を導入した。

[0094] CB1-SmSph: 5'-GGAGGGTGCATGCCGACTGAGCCCGGGCAGTAG  
CC-3' (配列番号23)

CB1-Bam: 5'-GCCGGGAGAGGATCCAGTGGAGG-3' (配列番号24)

CB1-Pst: 5'-GCTCGAGTACCTTACTGCAGGCACTGAGAG-3' (配列番号25)

[0095] 次に、プラスミドpUC118をXbaI及びEcoRIで消化し、DNAブランディングキットを用いて平滑化し、自己閉環し、プラスミドpUC118-SBNを構築した。このpUC118-SBNをHindIII及びSalIで消化し、同様の制限酵素で切り出される約1.4kbのcbh1プロモーター断片をクローン化した。これをSalIで消化し、全ての変異が導入された約2.8kbのcbh1翻訳領域及びターミネーター領域を連結し、pCB1-M2を構築した。導入した変異は下図の通りである(BamHIの変異は示していない)。

[0096] [表5]

<u>Sal I</u>	<u>Stu I</u>	
5'-ctagtcgactaaggccctgcgcacatcATGTATCAAAAGTTGGCCCTCATCTCGGCCTTCTTGGCTACT (配列番号26)		
MetTyrGlnLysLeuAlaLeuIleSerAlaPheLeuAlaThr (配列番号27)		
<u>Sma I</u>	<u>Sph I</u>	<u>Pst I</u>
<u>Xho I</u>	<u>Hind III</u>	
5'-GCCCGGGCTCAGTCGGCATGCACC - - -CAGTGCCCTGCAGTAAggtactcgagcaaaagcttgag-3' (配列番号28)		
AlaArgAlaGlnSerAlaCysThr - - -GlnCysLeuGln (配列番号29)		
↑ 成熟タンパク質のN末端		

[0097] 《実施例B2:N末端置換型STCE1発現ベクター及び天然型STCE1発現ベクターの構築、並びにトリコデルマ・ビリデへの形質転換及び活性評価》

[0098] (1) 発現ベクターの構築

天然型STCE1発現ベクターとして、実施例B1により得られたプラスミドpCB1-M2

に、STCE1遺伝子の翻訳領域を連結し、pCB-Steを構築した。

まず、STCE1遺伝子の翻訳領域を、プライマーSTCE1-TNERV及びSTCE1-TCET22Iの組み合わせで、プラスミドpUC118-STCEex (FERM BP-10127)を鋳型にPCRを用いて増幅し、得られる約1kbpのPCR産物をEcoRV及びEcoT22Iで消化したものを調製した。これをStuI及びPstIで消化しておいたpCB1-M2と連結し、pCB-Steを構築した。

[0099] STCE1-TNERV: GGGGATATCGCGCATCATGCGTTCCTCCCCCGT  
CCTC (配列番号30)

STCE1-TCET22I: GGGATGCATTTTAAAGGCACTGCGAGTACCAGT  
C (配列番号31)

[0100] N末端置換型STCE1発現ベクターとして、実施例B1により得られたプラスミドpCB1-M2に、STCE1遺伝子の翻訳領域のうち分泌シグナル配列を除いた成熟タンパク質翻訳領域を連結し、pCB-Stsを構築した。

まず、STCE1遺伝子の成熟タンパク質翻訳領域を、プライマーSTCE1-TmNSph及びSTCE1-TCET22Iの組み合わせで、プラスミドpUC118-STCEex (FERM BP-10127)を鋳型にPCRを用いて増幅し、得られる約1kbpのPCR産物をSphI及びEcoT22Iで消化したものを調製した。これをSphI及びPstIで消化しておいたpCB1-M2と連結し、pCB-Stsを構築した。

[0101] STCE1-TmNSph: GGGGCATGCGATGGCAAGTCGACCCGCTAC (配列番号32)

[0102] (2)トリコデルマ・ビリデstrain2の作出

トリコデルマ・ビリデ MC300-1株 (FERM BP-6047) の $10^9$  CFU/mL程度の孢子懸濁液をUV灯2灯を30cmの高さで点灯下、緩やかに混和しながら照射した。これを選択培地に塗布し、28°Cで7日間培養した。生育した株を選抜し、トリコデルマ・ビリデのウラシル要求株であるトリコデルマ・ビリデstrain2を取得した。

この選択培地は、最少培地[0. 2%リン酸2水素1カリウム、0. 4%硫酸アンモニウム、0. 03%尿素、0. 03%硫酸マグネシウム7水和物、0. 03%塩化カルシウム、0. 5%グルコース、2. 5%寒天、0. 01%トレースエレメント(5mg硫酸鉄7水和物、1. 5

6mg硫酸マンガン7水和物、1.4mg硫酸亜鉛7水和物、2mg塩化コバルトを1Lの水に溶解したもの)]に10  $\mu$ g/mLのウリジン及び1mg/mLの5-フルオロオロチン酸を添加したものである。

[0103] (3) 天然型STCE1及びN末端置換型STCE1を有する形質転換体

実施例B2(1)により得られたpCB-Ste及びpCB-Stsのトリコデルマ・ビリデへの形質転換は、実施例B2(2)により得られたトリコデルマ・ビリデstrain2にニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) 由来pyr4遺伝子を含むマーカープラスミドpPYR4とコトランスフォーメーション (co-transformation) 法で行い、最少培地で生育する株を形質転換体とした。

まず、トリコデルマ・ビリデstrain2を、50mLの菌体形成培地(1%イーストエキス、1%モルトエキス、2%ポリペプトン、2.5%グルコース、0.1%リン酸水素2カリウム、0.05%硫酸マグネシウム7水和物、0.0001%ウリジン(pH7.0))が分注された200mLの三角フラスコに植菌し、28°Cで2日間培養し、得られた菌体を遠心分離により回収し、0.5mol/Lシュクロースで洗浄した。これを3mg/mL  $\beta$ -グルクロニダーゼ(シグマ社製)、1mg/mLキチナーゼ及び1mg/mLザイモリアーゼ20T(生化学工業社製)を含む0.5mol/Lシュクロース溶液に懸濁し、30°Cで60-90分間緩やかに振とうし、プロトプラスト化した。得られたプロトプラストをろ過後、遠心分離により回収し、SUTC緩衝液で洗浄し、SUTEに懸濁したものをプロトプラスト懸濁液とした。

100  $\mu$ Lのプロトプラスト懸濁液に対し、10  $\mu$ LのDNA(pCB-Ste又はpCB-Sts)溶液を加え、氷冷下で5分間静置し、400  $\mu$ LのPEG溶液を加え、更に20分間氷冷下で静置した。以上の処理をしたプロトプラスト懸濁液は、SUTC緩衝液で洗浄し、0.5mol/Lシュクロースを含む最少培地に軟寒天とともに重層し、28°Cで5日間培養し、生育したコロニーを再度最少培地に移植し、ここで生育したコロニーを形質転換体とした。

[0104] (4) 培養上澄中の天然型STCE1及びN末端置換型STCE1のEGU活性の比較

得られた形質転換体を国際公開第98/11239号パンフレットに準じて培養し、その培養上澄を得た。この培養上澄をSDS-PAGEに供し、約45kDaのSTCE1のバ

ンドが良好に検出される培養上澄を選抜した。この培養上澄のpH10及びpH10におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を比較した結果を表6に示す。表6はpH10のEGU活性を100とし、その百分率で示した。

[0105] [表6]

	発現ベクター	EGU (%)	
		L A S 非添加	L A S 添加
天然型 S T C E 1	p C B - S t e	1 0 0	1 4 . 5
N末端置換型 S T C E 1	p C B - S t s	1 0 0	2 5 . 9

[0106] その結果、LAS添加区のEGU活性を比較すると、N末端置換型STCE1は天然型STCE1の約1.8倍の活性を有することが判明した。このときトリコデルマ・ビリデstrain2のEGU活性は検出されないことから、これらのEGU活性は導入されたベクターによって発現された組換え酵素に由来することが判明した。

[0107] (5) 天然型STCE1及びN末端置換型STCE1のN末端アミノ酸配列の解析

前記形質転換体の培養上澄を0.05mol/Lトリス塩酸(pH8.0)、1mol/L硫酸ナトリウム溶液とし、同等のベッドボリューム(BV)のトヨパールブチル650C(東ソー社製)に吸着させ、3BVの0.05mol/Lトリス塩酸(pH8.0)、1mol/L硫酸ナトリウムで非吸着成分を洗浄した。これを3BVの0.05mol/Lトリス塩酸(pH8.0)、0.5mol/L硫酸ナトリウムで溶出し、ペリコンXL(cut 5000, ミリポア社製)及びウルトラフリー15(cut 5000, ミリポア社製)で濃縮し、0.1mol/Lリン酸ナトリウム(pH5.8)、1mol/L硫酸アンモニウム溶液とした。これをリソースPHE(6mL, アマシャムバイオサイエンス社製)の疎水クロマトグラフィーに供し、非吸着画分を回収した。この画分を濃縮し、PD-10(アマシャムバイオサイエンス社製)で脱塩し、0.05mol/Lトリス塩酸(pH7.5)溶液とし、リソースQ(6mL, アマシャムバイオサイエンス社製)に供し、非吸着画分を回収した。この画分は脱塩後、0.05mol/L酢酸ナトリウム(pH5.0)溶液とし、リソースS(6mL, アマシャムバイオサイエンス社製)に供し、非吸着画分を回収した。この画分を濃縮後、スーパーデックス75pg(16×60mm, アマシャムバイオサイエンス社製)のゲルろ過に供し、分画分子量約45000の画分を回収した。本画分は、45kDaのバンドが単一に含まれていた。



精製画分をSDS-PAGEに供し、電気泳動されたタンパク質をPVDF膜に電氣的に転写した。このプロットから約45kDaのSTCE1のバンドを切り出した。これをプロテインシーケンサーModel 492(アプライドバイオシステムズ社製)に供し、アミノ酸配列を解読した。

その結果、pCB-Ste形質転換体から得られた天然型STCE1は、スタフィロトリクム・ココスボラム IFO(現NBRC) 31817株由来のSTCE1のDNA配列(配列番号5)と一致することを確認した。

一方、同様の手法によりN末端置換型STCE1形質転換体から得られたSTCE1はアミノ酸配列が解読できなかった。そこで、Pfuピログルタミン酸アミノペプチダーゼ(Pfu pyroglutamate aminopeptidase;タカラバイオ社製)を用いて修飾N末端を除去し、再度アミノ酸配列を解読した(配列番号4)。

これらの結果を基に、天然型STCE1及びN末端置換型STCE1のN末端アミノ酸及びその配列を比較するため、表7にまとめた。このことから構築した発現ベクター通りのN末端アミノ酸配列を有するSTCE1であることが明らかとなった。

[0108] [表7]

	N末端アミノ酸	N末端アミノ酸配列
天然型STCE1	アラニン(未修飾)	ADGKSTR(配列番号33)
N末端置換型STCE1	ピログルタミン酸(修飾)	pQSACDGKSTR(配列番号34)

[0109] (6) 精製天然型STCE1及び精製N末端置換型STCE1のEGU活性の比較

実施例B2(5)により得られた精製された天然型STCE1及びN末端置換型STCE1のpH10又はpH10におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を比較した結果を表8に示す。表8はpH10のEGU活性を100とし、その百分率で示した。

[0110] [表8]

	EGU (%)	
	LAS非添加	LAS添加
精製天然型STCE1	100	16.2
精製N末端付加型STCE1	100	30.0

[0111] その結果、LAS添加区のEGU活性を比較すると、精製N末端置換型STCE1は精製天然型STCE1の約1.9倍に向上していた。

[0112] 《実施例B3:STCE1へのN末端付加配列の変更とベクターの構築、並びにトリコデルマ・ビリデへの形質転換及び活性評価》

(1)成熟N末端にピログルタミン酸のみを付加した発現ベクターの構築

ピログルタミン酸のみを付加したSTCE1発現ベクターは、実施例B1により得られたプラスミドpCB1-M2にSTCE1遺伝子のうち分泌シグナル配列を除いた成熟タンパク質翻訳領域を連結し、pCB-Stm11として構築した。

まず、STCE1遺伝子の成熟タンパク質翻訳領域を、プライマーSTCE-TmNSma及びSTCE1-TCET22Iの組み合わせで、プラスミドpUC118-STCEex (FERM

BP-10127)を鋳型にPCRを用いて増幅し、得られる約1kbpのPCR産物をSmaI及びEcoT22Iで消化したものを調製した。これをSmaI及びPstIで消化しておいたpCB1-M2と連結し、pCB-Stm11を構築した。以上のように構築されたベクターpCB-Stm11を用いて形質転換されたトリコデルマ・ビリデは、pQADGKSTR (配列番号41)のN末端アミノ酸配列[すなわち、天然型STCE1のアミノ末端に1個のピログルタミン酸(pQ)が付加した配列]を有するSTCE1を生産する。

[0113] STCE-TmNSma:GGCCCGGGCTCAGGCCGATGGCAAGTCGACCCG (配列番号35)

[0114] (2)ピログルタミン酸付加STCE1のEGU活性比較

トリコデルマ・ビリデstrain2へのpCB-Stm11の形質転換は実施例B2(3)に従って行った。得られた形質転換体を国際公開第98/11239号パンフレットに準じて培養し、その培養上澄を得た。この培養上澄をSDS-PAGEに供し、約45kDaのSTCE1のバンドが良好に検出される培養上澄を選抜した。この培養上澄のpH10及びpH10におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を実施例B2(4)の天然型STCE1と比較した結果を表9に示す。表9はpH10のEGU活性を100としてその百分率で示した。

[0115] [表9]

	発現ベクター	EGU (%)	
		L A S 非添加	L A S 添加
天然型 S T C E 1	p C B - S t e	1 0 0	1 4 . 5
ピログルタミン酸付加 S T C E 1	p C B - S t m 1 1	1 0 0	2 3 . 0

その結果、LAS添加区のEGU活性を比較すると、ピログルタミン酸付加STCE1は天然型STCE1の約1.6倍の活性を有すること判明した。

[0116] 《実施例B4:STCE1へのN末端付加配列の変更とベクターの構築、並びにトリコデルマ・ビリデへの形質転換及び活性評価》

(1)成熟N末端にピログルタミン酸を含む4アミノ酸を付加した発現ベクターの構築

ピログルタミン酸を含む4アミノ酸を付加したSTCE1発現ベクターは、実施例B1により得られたプラスミドpCB1-M2にSTCE1遺伝子のうち分泌シグナル配列を除いた成熟タンパク質翻訳領域を連結し、pCB-Stm12として構築した。

まず、STCE1遺伝子の成熟タンパク質翻訳領域を、プライマーSTCE-TmNSph-2及びSTCE1-TCET22Iの組み合わせで、プラスミドpUC118-STCEex (FERM BP-10127)を鋳型にPCRを用いて増幅し、得られる約1kbpのPCR産物をSphI及びEcoT22Iで消化したものを調製した。これをSphI及びPstIで消化しておいたpCB1-M2と連結し、pCB-Stm12を構築した。以上のように構築されたベクターpCB-Stm12を用いて形質転換されたトリコデルマ・ビリデは、pQSACADGKSTR(配列番号42)のN末端アミノ酸配列[すなわち、天然型STCE1のアミノ末端に、4アミノ酸からなるペプチド(N末端がピログルタミン酸)が付加した配列]を有するSTCE1を生産する。

[0117] STCE-TmNSph-2:GGGCATGCGCCGATGGCAAGTCGACCCGC(配列番号36)

[0118] (2)ピログルタミン酸を含む4アミノ酸を付加したSTCE1のEGU活性比較

トリコデルマ・ビリデstrain2へのpCB-Stm12の形質転換は実施例B2(3)に従って行った。得られた形質転換体を国際公開第98/11239号パンフレットに準じて培養し、その培養上澄を得た。この培養上澄をSDS-PAGEに供し、約45kDaのSTCE1のバンドが良好に検出される培養上澄を選抜した。この培養上澄のpH10及びp

H10におけるLAS添加区のEGU活性を測定し、その低下の程度を実施例B2(4)の天然型STCE1と比較した結果を表10に示す。表10はpH10のEGU活性を100としてその百分率で示した。

[0119] [表10]

	発現ベクター	EGU (%)	
		LAS非添加	LAS添加
天然型STCE1	pCB-St <sub>e</sub>	100	14.5
ピログルタミンを含む 4アミノ酸付加STCE1	pCB-St <sub>m12</sub>	100	22.4

その結果、LAS添加区のEGU活性を比較すると、ピログルタミン酸を含む4アミノ酸付加型STCE1は天然型STCE1の約1.5倍の活性を有することが判明した。

#### 産業上の利用可能性

[0120] 本発明のタンパク質は、天然型のセルラーゼと比較して、界面活性剤存在下でエンドグ

ルカナナーゼ活性の低下が少ないことから、衣料用洗浄剤に配合した場合に有用である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

#### 図面の簡単な説明

[0121] [図1]エンドグルカナナーゼSTCE1のアミノ酸配列[シグナルペプチド(配列番号43)及び成熟タンパク質(配列番号44)]と、ファミリー45に属する公知のエンドグルカナナーゼであるNCE4[シグナルペプチド(配列番号45)及び成熟タンパク質(配列番号46)]及びNCE5[シグナルペプチド(配列番号47)及び成熟タンパク質(配列番号48)]の各アミノ酸配列とを比較した結果の内、そのN末端側配列に関する結果を示す説明図である。

[図2]図1に示す比較結果の内、そのC末端側配列に関する結果を示す説明図である。

#### 配列表フリーテキスト

[0122] 以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。配列番号6～10、12～13、15～18、21～26、28、30～32、又は35～36の配列で表される各塩基配列は、プライマーMNC-02、プライマーMNC-03、プライマーMKA-05、プライマーMKA-06、pMKD01、プライマーpMN-Bam、pJD01、プライマーNCE4-Ne、プライマーNCE4-Ce、プライマーNCE4-Ns、プライマーNCE4-Cs、プライマーCBn-Stu、プライマーCBc-Xho、プライマーCB1-SmSp h、プライマーCB1-Bam、プライマーCB1-Pst、pCB1-M2、pCB1-M2、プライマーSTCE1-TNERV、プライマーSTCE1-TCET22I、プライマーSTCE1-Tm NSph、プライマーSTCE1-TmNSma、及びプライマーSTCE1-TmNSph-2であり、配列番号11、14、27、又は29の配列で表される各アミノ酸配列は、pMKD01、pJD01、pCB1-M2、及びpCB1-M2である。

### 請求の範囲

- [1] エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質を、N末端がピログルタミン酸であるタンパク質に改変することを特徴とする、界面活性剤存在下でのエンドグルカナーゼ活性の低下を抑制する方法。
- [2] エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質のN末端に、ピログルタミン酸、若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸、又はピログルタミン酸若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端に含むペプチドを付加することにより、タンパク質の改変を実施する、請求項1に記載の方法。
- [3] エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質のN末端アミノ酸、又はそれを含む領域を、ピログルタミン酸、若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸、又はピログルタミン酸若しくはピログルタミン酸化可能なアミノ酸をN末端に含むペプチドで置換することにより、タンパク質の改変を実施する、請求項1に記載の方法。
- [4] エンドグルカナーゼ活性を有し、且つN末端がピログルタミン酸でないタンパク質が、ファミリー45に属するセルラーゼである、請求項1〜3のいずれか一項に記載の方法。
- [5] エンドグルカナーゼ活性を有し、且つアミノ酸改変によりN末端がピログルタミン酸に改変された、改変タンパク質。
- [6] 請求項1〜4のいずれか一項に記載の方法により得ることのできる、請求項5に記載のタンパク質。
- [7] 下記からなる群より選択される、タンパク質：
- (a) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質、
  - (b) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表されるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質、及び
  - (c) 配列番号2、配列番号4、配列番号38、又は配列番号40で表わされるアミノ酸

配列を含むタンパク質と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有する相同タンパク質。

[8] 請求項5〜7のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[9] 下記からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(a) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列を含み、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び

(c) 配列番号1、配列番号3、配列番号37、又は配列番号39で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ界面活性剤存在下で活性低下の少ないエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[10] 請求項8又は9に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[11] 請求項10に記載の発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

[12] 宿主が、酵母又は糸状菌である、請求項11に記載の宿主細胞。

[13] 糸状菌が、フミコーラ属又はトリコデルマ属に属する微生物である、請求項12に記載の宿主細胞。

[14] 糸状菌が、フミコーラ・インソレンス又はトリコデルマ・ベリデである、請求項13に記載の宿主細胞。

[15] 請求項11〜14のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程、及び前記培養によって得られる宿主細胞又はその培養物から請求項5〜7のいずれか一項に記載のタンパク質を採取する工程を含む、前記タンパク質の製造方法。

[16] 請求項15に記載の製造方法で生産されたタンパク質。

[図 1]

NCE4	MRSSPLLRSAVVAALPVLAL-----AADGKSTRYWDCKPSCGWAK	21
	***** *	
STCE1	MRSSPVLRTALAAALPLAALA-----ADGKSTRYWDCKPSCSWPG	20
	* ***** *	
NCE5	MQLPLTLLTLLPALAA-----AQSGSGRTTRYWDCKPSCAWPG	23
	<u>シグナルペプチド</u> → <u>触媒領域</u> →	
NCE4	KAPVNPVFSCNANFQRLTDF-DAKSGCEPGGVAYSCADQTPWAVNDFA	70
	** ***** * ***** * **** ** ** ***** *	
STCE1	KASVNPVFACSANFQRI SDP-NVKS GCD-GGSAYACADQTPWAVNDNFS	68
	* ** * * * **** ** ** * ** ***** *	
NCE5	KGPA-PVRTCDRWDNPLFDGGNTRSGCDAGGGAYMCSDQSPWAVSDDLA-	71
NCE4	FGFAATSIAGSNEAGWCCACYELTFTSGPVAGKKMVVQSTSTGGDLGSNH	120
	***** * **** **** ***** ***** *	
STCE1	YGFAATSI SGGNEASWCCG CYELTFTSGPVAGKTMVVQSTSTGGDLGTNH	118
	** ** * * ** **** ***** * ** ***** *	
NCE5	YGWAAVNIAGSNERQWCCACYELTFTSGPVAGKRMIVQASNTGGDLGNNH	121
NCE4	FDLNI PGGGVGIFDGCTPQFGGLP-GQRYGGISSRNECDRFPDALKPG	167
	*** ***** ***** * **** ** ** *****	
STCE1	FDLAMPGGGVGIFDGCSPQFGGLA-GDRYGGVSSRSQCDSFPAALKPG	165
	** ***** * * * * **** * * ** ** *****	
NCE5	FDIAMPGGGVGIFNACTDQYGAPPNGWGQRYGGISQRHECDAPFEKLKPG	171



2/2

[図 2]

NCE4	CYWRFDWFKNADNPSFSFRQVQCPAELVARTGCRRNDDGNFPAVQIPSSS	217
	***** * ***** ***** **	
STCE1	CYWRFDWFKNADNPTFTFRQVQCPSELVARTGCRRNDDGNFPVFTPPSGG	215
	***** ***** *** ** * ** * *	
NCE5	CYWRFDWFLNADNPSVNWQVSCPAEIVAKSGCSR-----	206
	リンカー→	
NCE4	TSSPVGQPTSTSTTSTTTSSPPVQPTTPS-----GCTAERWA	255
	** * ***** * * ** * **	
STCE1	QSSSSSSSSSAKPTSTSTTSTKATSTTSTASSQTSSSTGGGCAAQRWA	265
NCE5	-----	
	CBD→	
NCE4	CQCGNGWSGCTTCVAGSTCTKINDWYHQCL	286
	***** * ***** * ** * *****	
STCE1	CQCGGIGFSGCTTCVSGTTCNKQNDWYSQCL	295
NCE5	-----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018184

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N9/24, C12N15/09, C12N1/21, C12P21/02, C07K1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N9/24, C12N15/09, C12N1/21, C12P21/02, C07K1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)  
Genebank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 94/07998 A (NOVO-NORDISK AS), 14 April, 1994 (14.04.94), & EP 663950 A & US 5792641 A & US 6114296 A & JP 08-501692 A	7-16 1-6
Y	WO 98/03667 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 29 January, 1998 (29.01.98), & JP 10-506808 A & EP 953644 A1 & US 6403362 B1	1-16
Y	WO 98/11239 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 19 March, 1998 (19.03.98), & EP 952223 A & JP 10-513027 A & US 6277596 B1	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 February, 2005 (28.02.05)

Date of mailing of the international search report  
15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018184

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 91/17243 A (NOVO-NORDISK AS), 14 November, 1991 (14.11.91), & EP 531372 A & JP 05-509223 A & US 5948672 A & JP 2000-217583 A & US 2001/36910 A & JP 2001-57894 A & JP 2003-70489 A & US 2003/119167 A	1-16
Y	WO 97/43409 A (NOVO-NORDISK AS), 20 November, 1997 (20.11.97), & EP 898618 A & US 6270968 B1	1-16
Y	Maeda I. et al., Purification and characterization of a cellulase from the giant snail Achatina fulica., Biosci.Biotechnol.Biochem., (1996), Vol.60, No.1, pages 122 to 124	1-16
Y	Elizabeth J. Waters et al., Sequence analysis of grape(Vitis vinifera) berry chitinases that cause haze formation in wines., J.Agric.Food Chem., (1998), Vol.46, pages 4950 to 4957	1-16
Y	Klarskov K. et al., Cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei: indentification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein., Carbohydr Res. (1997), Vol.304, No.2, pages 143 to 154	1-16
A	F.P.M.O'Harte et al., Improved stability, insulin-releasing activity and antidiabetic potential of two novel N-terminal analogues of gastric inhibitory polypeptide:N-acetyl-GIP and pGlu-GIP., Diabetologia(2002), Vol.45, pages 1281 to 1291	1-16
A	Odagaki Y. et al., The crystal structure of pyroglutamyl peptidase I from Bacillus amyloliquefaciens reveals a new structure for a cysteine protease., Structure Fold Des. (1999), Vol.7, No.4, pages 399 to 411	1-16

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>7</sup> C12N9/24, C12N15/09, C12N1/21, C12P21/02, C07K1/02		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C12N9/24, C12N15/09, C12N1/21, C12P21/02, C07K1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 94/07998 A (NOVO-NORDISK AS) 1994. 04. 14 & EP 663950 A & US 5792641 A & US 6114296 A & JP 08-501692 A	<u>7-16</u> 1-6
Y	WO 98/03667 A (明治製菓株式会社) 1998. 01. 29 & JP 10-506808 A & EP 953644 A1 & US 6403362 B1	1-16
Y	WO 98/11239 A (明治製菓株式会社) 1998. 03. 19 & EP 952223 A & JP 10-513027 A & US 6277596 B1	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 <div style="text-align: right;">28. 02. 2005</div>	国際調査報告の発送日 <div style="text-align: right; font-size: 1.2em;">15. 3. 2005</div>	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高 美葉子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 91/17243 A (NOVO-NORDISK AS) 1991. 11. 14 & EP 531372 A & JP 05-509223 A & US 5948672 A & JP 2000-217583 A & US 2001/36910 A & JP 2001-57894 A & JP 2003-70489 A & US 2003/119167 A	1 - 1 6
Y	WO 97/43409 A (NOVO-NORDISK AS) 1997. 11. 20 & EP 898618 A & US 6270968 B1	1 - 1 6
Y	Maeda I, et. al., Purification and characterization of a cellulase from the giant snail Achatina fulica., Biosci Biotechnol Biochem. (1996), Vol. 60, No. 1, p. 122-124	1 - 1 6
Y	Elizabeth J. Waters, et. al., Sequence analysis of grape (Vitis vinifera) berry chitinases that cause haze formation in wines., J. Agric. Food Chem. (1998), Vol. 46, p. 4950-4957	1 - 1 6
Y	Klarskov K, et. al., Cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei: identification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein., Carbohydr Res. (1997), Vol. 304, No. 2, p. 143-154	1 - 1 6
A	F. P. M. O'Harte, et. al., Improved stability, insulin-releasing activity and antidiabetic potential of two novel N-terminal analogues of gastric inhibitory polypeptide: N-acetyl-GIP and pGlu-GIP., Diabetologia (2002), Vol. 45, p. 1281-1291	1 - 1 6
A	Odagaki Y, et. al., The crystal structure of pyroglutamyl peptidase I from Bacillus amyloliquefaciens reveals a new structure for a cysteine protease., Structure Fold Des. (1999), Vol. 7, No. 4, p. 399-411	1 - 1 6